

令和元年6月6日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08499

研究課題名(和文) Cav1.2チャネルの活性とカルモジュリン結合部位との機能的相関の解明

研究課題名(英文) Conformation of Cav1.2 channel in the inactivated state by calmodulin binding

研究代表者

蓑部 悦子 (Minobe, Etsuko)

鹿児島大学・医歯学域医学系・講師

研究者番号：00448581

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：カルモジュリン(CaM)によるCav1.2チャネルの不活性化の分子機構について、C末端部にCaMをリンクさせたチャネル、さらにN末端部のCaM結合部位に変異を導入したチャネルとN末端配列を欠損したチャネルを用いて、パッチクランプ法による解析を行った。N末端部に変異を導入したチャネルは、Ca²⁺濃度依存性の不活性化は欠失したが、外部のCaMによる不活性化を示した。このことから、リンクさせたCaMによる不活性化にはチャネルのN末端配列が必須であることが示唆された。結論として、CaMによるCav1.2チャネルの不活性化には、N末端部が関与するものとしめないものとの複数の様式があると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Cav1.2チャネルを含むL型Ca²⁺チャネルは、心筋、骨格筋、神経系や分泌細胞に分布し、筋収縮、遺伝子発現、シナプス伝達、ホルモン分泌などにおいて重要な役割をもつため、本研究により得られた知見を広く応用できる。また、カルモジュリンの遺伝子異常から病態につながる例も報告されており、カルモジュリンによるチャネルの活性調節は重要な位置づけにある。

研究成果の概要(英文)：Activity of Cav1.2 channels requires calmodulin (CaM). Conformation of the channel-CaM complex has been reported, but they are still in debate. We have investigated the conformation of Cav1.2 channel in the inactivated state by recording the activity of carboxyl-terminal (CT) deletion channel linked to CaM (CaM-linked channel), W82A-CaM-linked channel and amino-terminal (NT) deletion CaM-linked channel (deIN-CaM-linked channel), using the patch-clamp technique. The CaM-linked channel showed both Ca²⁺ and CaM dependent inactivation, while the W82A-CaM-linked channel and the deIN-CaM-linked channel showed only CaM-dependent inactivation but not Ca²⁺-dependent inactivation. These results suggest that the inactivation induced by one CaM linked with channel may require the NT of the channel, while more than one CaM induced inactivation may take place without NT, but within CT of the channel. Thus, there might be two types of conformation of Ca²⁺-dependent inactivation of Cav1.2.

研究分野：電気生理学、分子生物学

キーワード：カルシウムチャネル カルモジュリン パッチクランプ法 inside-out Cav1.2 カルシウムイオン r
un-down ATP

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Cav1.2 チャンネルは細胞内 Ca 濃度の変化に応じて、その活性が調節され、Ca²⁺結合タンパクであるカルモジュリンによって仲介される。これまでにカルモジュリンによる Cav1.2 チャンネルの活性調節については様々な分子モデルが提唱されているが、統一した見解には至っていない。従来のモデルは 1 分子のカルモジュリンが細胞内 Ca²⁺濃度の上昇に伴い、チャンネルとの結合様式を変えることで、チャンネルの活性化や不活性化を起こすというものである。一方、我々の研究では、パッチクランプ法のうち inside-out 法を用いた解析から、Cav1.2 チャンネルは Ca²⁺濃度依存性の調節に加えて、カルモジュリン濃度依存性の調節を受けることを見出した。また、チャンネル断片ペプチドとカルモジュリンの結合実験 (pull-down assay) をもとに、複数のカルモジュリンが同時に結合する可能性を示した。カルモジュリン濃度依存性の調節機構を説明するために、我々は 1 分子のカルモジュリンがチャンネルを活性化し、さらに別のカルモジュリンがチャンネルを不活性化するという 2 分子のカルモジュリンの結合によるチャンネルの活性調節モデルを提唱した [Minobe et al., 2019: 学会発表、2017: 学会発表]。これまでに他研究室から報告されたモデルでは、1 分子のカルモジュリンが Ca²⁺/カルモジュリンになり、チャンネルを不活性化に導くとされており、複数のカルモジュリンによる調節の可能性については検討されていない。不活性化状態のチャンネルとカルモジュリンの結合様式については、チャンネルのカルボキシル(C)末端領域での変化を示したモデルと、アミノ(N)末端と C 末端を繋ぐ様式のモデルが報告されている。

2. 研究の目的

Cav1.2 チャンネルの活性とカルモジュリンの結合部位との機能的相関を明らかにすることを目的とした。カルモジュリンは Ca²⁺チャンネルの活性調節の主因子である。その結合部位はチャンネルの細胞内領域に複数あるが、結合と機能の関係は明らかでない。また、チャンネルの C 末端領域には、カルモジュリンの結合部位に加え、リン酸化部位や Ca²⁺結合部位、チャンネル活性抑制配列があり、チャンネルの活性を修飾する [Lei et al., 2018; Lyu et al, 2017: 雑誌論文、Gao et al., 2017, 2018: 学会発表]。そこで、チャンネルの C 末端部を切断し、カルモジュリンを繋いだ変異体を用いて、C 末端領域の影響のないチャンネルでカルモジュリンの作用を検討した。カルモジュリンの結合部位はチャンネルの N 末端部と C 末端部にあるが、本研究では、N 末端部のカルモジュリンの結合部位に変異を導入した変異体と N 末端部を欠損した変異体を作成し、N 末端部を介するカルモジュリンの作用について、パッチクランプ法を用いて検討した。

3. 研究の方法

HEK293 細胞に、Cav1.2 チャンネルの $\alpha 1C$ 、 $\beta 2a$ 、 $\alpha 2\delta$ サブユニットを共発現させ、inside-out 法で活性を記録する。 $\alpha 1C$ サブユニットは、野生型、1671 番アミノ酸以降を除いた変異体にグリシン鎖を介してカルモジュリンをリンクさせた変異体 (CaM-linked channel)、さらに CaM-linked channel の N 末端部にあるカルモジュリンの結合部位にアミノ酸変異を加えた変異体 (W82A-CaM-linked channel) と N 末端部を切断した変異体 (delN-CaM-linked channel) を使用した。各チャンネルサブユニットのプラスミドは、Mori et al. により作成されたもの [Mori et al., 2004: Science] を改変して使用した。チャンネルの発現効率率、プラスミドに組み込まれた蛍光タンパク GFP により確認した。カルモジュリンは HEK293 からクローニングし、大腸菌 BL21 で合成した後、疎水性カラムを用いてゲル濾過生成した。これまでの研究をふまえ、基準となるチャンネル活性(対照)は、80 nM Ca²⁺、1 μ M カルモジュリン、3 mM ATP に調整したテスト溶液(細胞内液に相当)で測定した。Inside-out の状態(cell-free 系)でチャンネルの活性を維持するためには、カルモジュリンと ATP が必須である [Minobe et al., 2017: 雑誌論文、2018: 学会発表] 以下の実験を行った。

(1)N 末端に変異を導入したチャンネル変異体の作成

CaM-linked channel を基に 2 つの N 末端変異体を作成した。チャンネルの N 末端部にはカルモジュリン結合部位があることが報告されている。我々も結合実験によって、C 末端部と同じく N 末端部にカルモジュリンが結合することを確認した。そこで whole-cell clamp 法による実験に

よりチャネルの不活性化が阻害されることが報告されている変異(W82A)をCaM-linked channelに導入した(W82A-linked channel)。また、N末端の細胞内ドメインを切断した変異体(delN-CaM-linked channel)を作成した。

(2)パッチクランプ法による解析

Inside-out法で、CaM-linked channelとその2つのN末端部変異体の活性を調べた。Ca²⁺濃度依存性の不活性化は高濃度Ca²⁺(10μM)を、カルモジュリン濃度依存性の不活性化は高濃度カルモジュリン(10μM)を付加した条件でのチャネル活性を解析することにより判定した。チャネル活性を安定させるために3mM ATP存在下で実験を行った。

4. 研究成果

対照実験(80 nM Ca²⁺、3 mM ATP)では、CaM-linked channel、W82A-linked channel、delN-CaM-linked channelは同程度の活性を示した。

CaM-linked channelは、対照実験に対し、10μM Ca²⁺付加実験と10μMカルモジュリン付加実験ともに有意に活性が減少した。2つのチャネルN末端変異体(W82A-linked channelとdelN-CaM-linked channel)は、10μM Ca²⁺付加実験では対照実験と差がなかったが、10μMカルモジュリン付加実験では有意に活性が減少した。10μMカルモジュリン付加実験での活性の減少は、W82A-linked channelと比較してdelN-CaM-linked channelが顕著であった。

つまり、CaM-linked channelはCa²⁺濃度依存性とカルモジュリン濃度依存性に不活性化を示した。しかし、W82A-linked channelとdelN-CaM-linked channelにはCa²⁺濃度依存性の不活性化はなく、カルモジュリン濃度依存性の不活性化のみを示した。

対照実験と10μM Ca²⁺付加実験は、リンクされた1分子のカルモジュリンによるチャネルの不活性化をみているため、N末端変異体(チャネルのN末端部にカルモジュリンが結合しない)では、1分子のカルモジュリンによる不活性化が起こらないことが示唆された。

10μMカルモジュリン付加実験では、Ca²⁺濃度とは無関係に、リンクされたカルモジュリンに加えて外部のカルモジュリンの作用によって、不活性化が起きる。このカルモジュリン濃度依存性の不活性化はN末端変異体でも確認されたため、複数のカルモジュリンによる不活性化は、チャネルN末端部を介さない結合様式で制御されることが示唆された。

チャネルの活性とカルモジュリン結合部位との機能的相関を明らかにするには、更に実験を要するが、本研究から、Cav1.2チャネルの不活性化には、チャネルN末端を要する様式と要しないものがあることが考えられる。このことは外部のカルモジュリンによる不活性化がチャネルのC末端への結合によって起こることを示唆し、我々の提唱する2分子のカルモジュリンによるチャネルの活性調節モデルに矛盾しない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Q Gao, E Minobe, M Kameyama, J Xu. Purification of insoluble GST-fused and GST-cleaved Cav1.2 channel fragment by denaturation and renaturation. Protein Expression and Purification. 査読有. Vol.160, 2019, 7-10. DOI: 10.1016/j.pep.2019.03.013

J Li, Z Yu, J Xu, R Feng, Q Gao, T Boczek, J Liu, Z Li, Q Wang, M Lei, J Gong, H Hu, E Minobe, HL Ji, M Kameyama, F Guo. The Effect of Ca²⁺, Lobe-Specificity, and CaMKII on CaM Binding to Nav1.1. International Journal of Molecular Sciences. 査読有. Vol.19, No.9, 2018, 2495-2510. DOI: 10.3390/ijms19092495

M Lei, J Xu, Q Gao, E Minobe, M Kameyama, L Hao. PKA phosphorylation of Cav1.2 channel modulates the interaction of calmodulin with the C terminal tail of the channel. Journal of Pharmacological Sciences. 査読有. Vol.137, No.2, 2018, 187-194. DOI: 10.1016/j.jphs

L Lyu, Q Gao, J Xu, E Minobe, T Zhu, M Kameyama. A new interaction between proximal and distal C-terminus of Cav1.2 channels. Journal of Pharmacological Sciences. 査読有. Vol. 133, 2017, 240-246. DOI: 10.1016/j.jphs.2017.03.002

E Minobe, MX Mori, M Kameyama. Calmodulin and ATP support activity of the Cav1.2 channel through dynamic interactions with the channel. The Journal of Physiol. 査読有. Vol. 595, No. 8, 2017, 2465-2477. DOI: 10.1113/JP273736

L Yu, J Xu, E Minobe, A Kameyama, L Yang, R Feng, L Hao, M Kameyama. Role of protein phosphatase in the run down of guinea pig cardiac Cav1.2 Ca²⁺ channels. American Journal of Physiology. Cell Physiology. 査読有. Vol. 310, No. 10, 2016, C773-779. DOI: 10.1152/ajpcell.00199.2015

〔学会発表〕(計 8 件)

E Minobe, MX Mori, M Kameyama. Cav1.2 channel inactivation induced by two molecules of calmodulin. 9th FAOPS Congress. 2019

M Kameyama, E Minobe, J Xu, Q Gao. Structure analysis of the binding between Cav1.2 channel and calmodulin. 9th FAOPS Congress. 2019

亀山 正樹、蓑部 悦子、徐 建軍、高 青華 カルモジュリンの Cav1.2 型 Ca チャネルへの結合の分子シミュレーション 生理学研究所研究会 心臓・血管系の頑健性と精緻な制御を支える分子基盤の統合的解明 2018

亀山 正樹、蓑部 悦子、徐 建軍、高 青華 Cav1.2 型 Ca チャネルへのカルモジュリンの結合モデル：分子シミュレーション研究 第 69 回西日本生理学会 2018

E Minobe, MX Mori, M Kameyama. Cav1.2 channel regulation by calmodulin and ATP: A study on genetically mutated channels. 第 95 回日本生理学会大会 2018

Q Gao, M Lei, J Xu, E Minobe, Y Zhu, L Hao, M Kameyama. Cav1.2 channel regulation by PKA phosphorylation involves modulation of calmodulin binding to the channels. 第 95 回日本生理学会大会 2018

高 青華、雷 明、徐 建軍、蓑部 悦子、朱 曜南、Hao 麗英、亀山 正樹 Cav1.2 型 Ca²⁺チャネル C 末端部における PKA リン酸化のチャネル活性調節機序 第 68 回西日本生理学会 2017

E Minobe, Masayuki X Mori, Masaki Kameyama Regulation of Cav1.2 channels by calmodulin: A study on genetically mutated channels. 第 94 回日本生理学会大会 2017

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~physiol2/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：森 誠之

ローマ字氏名：Mori Masayuki

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。